

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-249122

(43)公開日 平成5年(1993)9月28日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 33/68		7055-2 J		
21/78	A	7906-2 J		
31/00	V	7906-2 J		
31/22	1 2 1 F	9015-2 J		
33/52	B	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 20 頁)

(21)出願番号 特願平4-339552

(22)出願日 平成4年(1992)11月27日

(31)優先権主張番号 8 0 0 2 7 2

(32)優先日 1991年11月29日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391007079

マイルス・インコーポレーテッド  
MILES INCORPORATED  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、  
エルクハート、ミルトル・ストリート  
1127

(72)発明者 ガンテル・フランケ  
ドイツ国、5653 ライヒリンゲン、ランド  
ラートトリムポーンシュトラッセ・デー  
(番地なし)

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 尿タンパク質検定のための改良された組成物および試験具ならびにそれを用いる方法

(57)【要約】

【構成】 尿中のタンパク質に関する検定のための、指示色素、緩衝剤、疎水性高分子化合物および水を含む担体を包含する指示試薬組成物、試験具および試験方法。

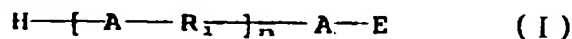
【効果】 本発明の指示試薬組成物は、試験試料の比重による干渉を受けず、特に約30mg/dL以下の低タンパク質濃度のタンパク質の検出および識別を可能にし、擬陽性の数の少ない、正確で信頼できる検定を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンパク質含有試験試料と接触すると、十分な色遷移を呈して試験試料中のタンパク質の存在または濃度を明らかにすることができる指示試薬組成物であって、以下のものを含む指示試薬組成物：

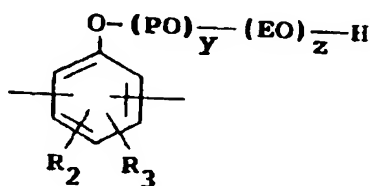
- (a) タンパク質と相互作用し、色遷移を呈することができる指示色素；
- (b) 緩衝剤；
- (c) 一般式：

【化 1】



(式中、Aは

【化 2】



であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R<sub>1</sub> はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R<sub>1</sub> がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR<sub>1</sub> が酸素の場合、ヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物；および

- (d) 水を含む好適な担体。

【請求項 2】 指示色素が、組成物1リットル当たり約0.05～約0.6mmolの量で存在する、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】 指示色素が、オクタハロスルホフタレイン型色素、オクタハロフェノールフタレイン型色素またはその組み合わせである、請求項1記載の組成物。

【請求項 4】 指示色素が、テトラブロモフェノール・ブルー、テトラクロロフェノール・ブルー、3', 3'', 5, 5''-テトラヨード-3, 4, 5, 6-テトラブロモフェノールスルホフタレイン、3, 3''-ジヨード-5, 5'', 3, 4, 5, 6-ヘキサブロモフェノールスルホフタレイン、およびその組み合わせより成る群から選択される、請求項1記載の組成物。

【請求項 5】 緩衝剤が、組成物を実質的に一定の酸性pHに緩衝する、請求項1記載の組成物。

【請求項 6】 緩衝剤が、クエン酸、マレイン酸、酒石酸、フタル酸、スルホサリチル酸、コハク酸、マロン酸、それらのアルカリ金属およびアンモニウム塩、ならびにその組み合わせより成る群から選択される、請求項

5記載の組成物。

【請求項 7】 疎水性高分子化合物が、組成物1ml当たり約1～約8重量%の量で存在する、請求項1記載の組成物。

【請求項 8】 試験試料の比重による干渉を事実上受けない、試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定する方法であって、以下の(i)および(ii)を含む方法：

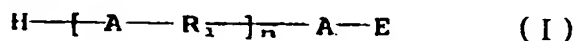
- (i) 試験試料を、以下のものを含む指示試薬組成物と接触させること；

(a) タンパク質と相互作用し、色遷移を呈することができる指示色素；

- (b) 緩衝剤；

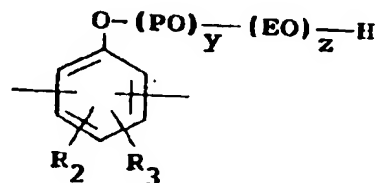
- (c) 一般式：

【化 3】



(式中、Aは

【化 4】



であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は、それぞれ、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R<sub>1</sub> はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R<sub>1</sub> がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR<sub>1</sub> が酸素の場合、ヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物；および

- (d) 水を含む好適な担体。

(ii) 指示試薬組成物の色遷移の強度および度合いから、試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定すること。

【請求項 9】 液体試験試料の比重による干渉を事実上受けない、液体試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定する方法であって、以下の(i)および(ii)を含む方法：

- (i) 液体試験試料を、以下のものを含む指示試薬組成物を包含する担体マトリックスを含む試験パッドからなる分析対象物検出と接触させること；

(a) タンパク質と相互作用し、色遷移を呈することができる指示色素；

- (b) 緩衝剤；

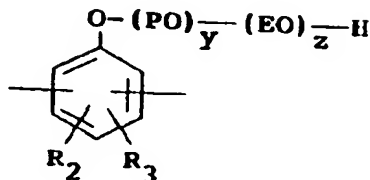
- (c) 一般式：

【化5】



(式中、Aは

【化6】



であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は、それぞれ、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R<sub>1</sub> はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R<sub>1</sub> がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR<sub>1</sub> が酸素の場合、ヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物；および

(d) 水を含む好適な担体。

(ii) 該分析対象物検出具を、液体試験試料中のタンパク質含量に応答する色遷移について試験すること。

【請求項10】 以下のものを含む、試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定するための分析対象物検出具：

(i) 支持ストリップ；および

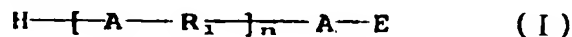
(ii) 以下のものを含む指示試薬組成物を包含する担体マトリックスを含む試験パッド：

(a) タンパク質と相互作用し、色遷移を呈することができる指示色素；

(b) 緩衝剤；

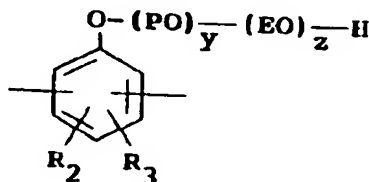
(c) 一般式：

【化7】



(式中、Aは

【化8】



であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から

選択され；R<sub>1</sub> はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R<sub>1</sub> がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR<sub>1</sub> が酸素の場合、Eはヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物；および

(d) 水を含む好適な担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タンパク質の存在または濃度に関する試験試料の検定の改良された組成物、試験具および方法に関する。より詳細には、本発明は、担体マトリックスに包含された新規で改良された指示試薬組成物を含む試験パッドを含有する試験具を用いることによる、タンパク質、特に陰性および痕跡量のタンパク質に関する液体試験試料、例えば尿の検定のための組成物、方法および試験具に関する。ここで、検出可能または測定可能な応答は、試験パッドとタンパク質含有液体との接触に際して起こる。

【0002】新規で改良された指示試薬組成物は、以下のものを含む。即ち：

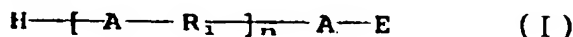
(1) アルブミンと相互作用し、検出可能な応答、例えば色遷移を起すことができる指示色素；

(2) 緩衝剤；および

(3) 以下の一般式(I)を有する疎水性高分子化合物

【0003】

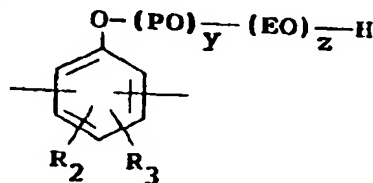
【化9】



【0004】(式中、Aは

【0005】

【化10】



【0006】であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R<sub>1</sub> はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R<sub>1</sub> がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR<sub>1</sub> が酸素の場合、ヒドロキシである）

【0007】新規の指示試薬組成物は、試験パッド中における改良された色解像を提供し、それにより陰性量のタンパク質を含有すると検定された試験試料と痕跡量のタンパク質を含有すると検定された試験試料との間の改

良された色識別を提供する。したがって、タンパク質に関する擬陽性の数を実質的に減少する。アルブミンに関する擬陽性検定の数を実質的に減少することによって、試験試料中の痕跡量のタンパク質の存在を確認するための不必要な確認検定の実施がより少数となる。

【0008】さらに、本発明は、新規の指示試薬組成物を担体マトリックスに包含させて、乾相試験ストリップ検定手順による試験試料中のアルブミンのようなタンパク質の存在または濃度の測定のための、改良された方法における試験具の試験パッドを提供することに関する。

【0009】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】アルブミンは、最も豊富な血漿タンパク質であり、一般に哺乳類血漿の総タンパク質の半分より少し多くを構成する。人体においては、アルブミンは血液と組織との間の水分バランスを調節し、水にわずかししか溶解しない種々の化合物、例えば、ビリルビン、脂肪酸、コルチゾール、チロキシンならびにスルホンアミドおよびバルビツレートのような薬物のための輸送分子として機能する、重要な役割を有する。

【0010】アルブミン欠乏は、わずかに水溶性の物質の体内の輸送を制限し得る。そして、欠乏は、個体において、漿液の異常な蓄積または水腫によって警報を発される。したがって、個体が血清アルブミン欠乏を有するかどうかを決定することは、臨床的に重要である。

【0011】同様に、個体が過剰量のタンパク質を排出しているかどうかを決定することは、臨床的に重要である。正常に機能している腎臓は、事実上二段階の過程で尿を生成する。血液は、腎臓の糸球体または糸球体領域を通過して流れる。糸球体の毛細血管壁は、水および血漿の低分子成分に高度に透過性である。アルブミンおよびその他の高分子タンパク質は、これらの毛細血管壁を通過できず、タンパク質が体によって利用可能になるように、事実上尿から濾し分けられる。低分子成分を含有する液体は、腎臓の尿細管または尿細管領域に通過して入り、ここでいくらかの尿成分、例えば低分子タンパク質の再吸収；その他の尿成分の分泌；および尿の濃縮が起こる。結果として、糸球体と尿細管との併合した過程を通して、尿中タンパク質の濃度は最少となるべきである。したがって、尿中の異常に高い量のアルブミンは、検出され、生理学的機能不全に関連付けられなければならない。

【0012】個体の比較的高濃度の尿中アルブミンは、通常、疾病状態の指標である。例えば、尿中タンパク質の平均正常濃度は、約10mg/dL～約20mg/dLまで変わり、総尿タンパク質のおよそ5分の1が血清アルブミンとなる。しかしながら、疾病状態の多数において、尿タンパク質レベルは、アルブミンが排出されたタンパク質の約60～約90%を示すように、認め得る程に増加する。

【0013】異常に増加した量の尿中タンパク質の存在は、タンパク尿として知られており、腎臓病の最も重大な指標の一つであって、その他の種々の非腎臓関連疾病の指標でもあり得る。

【0014】したがって、個体がアルブミン欠乏を有するかどうか、または個体が過剰量のタンパク質を排出するかどうかを決定するために、ならびに治療の有効性を測定するための医療経過の監視のために、簡単、正確および廉価なタンパク質検出検定が開発されてきた。さらに、尿または血清中のタンパク質の検出または測定のために開発されたいくつかの検定方法のうち、色素結合技術に基づく方法が特に有用であることが証明されている。これは、色素結合法が容易に自動化でき、再現性の良い正確な結果を提供するためである。

【0015】一般に、色素結合技術は、アルブミンのようなタンパク質と相互作用することができ、タンパク質と相互作用するとpHの変化なしに色変化する可以利用するpH指示色素を利用する。pH指示色素がタンパク質と相互作用し、またはタンパク質に結合する場合、指示色素の見掛け上の $pK_a$ （酸解離定数）が変化し、色素はいわゆる「タンパク誤差」現象を生じて色遷移を起こす。

【0016】色素結合技術を利用する方法においては、実質的なpHシフトによるpH指示色素の色遷移を防止するために、適当な緩衝剤がpH指示色素を一定のpHに維持する。「タンパク誤差」現象によって、pH指示色素は、タンパク質と相互作用すると、pHの変化によって生じる色変化と同一の色遷移を起こす。タンパク質と相互作用または結合し、「タンパク誤差」色遷移を呈することができる、タンパク質の乾相検定に用いられるpH指示色素の例としては、テトラプロモフェノール・ブルー（TPB）およびテトラクロロフェノール-3, 4, 5, 6-テトラプロモスルホフタレインが挙げられる。

【0017】pH指示色素はタンパク質検定において広範に用いられているが、指示色素を利用するタンパク質検定法にはいくつかの欠点が存在する。例えば、pH指示色素に基づく方法は、約15～約30mg/dLの痕跡タンパク質濃度と、約15mg/dL未満の陰性タンパク質濃度との間を、定量的に十分に識別することができない。陰性タンパク質濃度は、尿中に存在するタンパク質の正常バックグラウンド量であり、臨床的に有意ではない。痕跡タンパク質濃度は、尿中タンパク質の少し上昇した量を示し、臨床的に有意である。痕跡量のタンパク質を示す検定は、尿中に上昇した量のタンパク質が存在することを結論的に示すために、確認検定を必要とする。

【0018】試験試料中の総タンパク質含量の測定のためのいくつかの簡単で定量的な検定が利用可能であるが、簡単な比色試薬試験ストリップを顕著な例外として、これらの検定法の多数が、定量的タンパク質測定をするためにタンパク質沈殿を必要とする。したがって、確認検定は、タンパク質含量に関する尿試料のスクリー

ニングに用いられる試験ストリップ検定よりも、時間がかかり、より高価である。したがって、痕跡量のタンパク質に関して擬陽性検定の数を実質的に減少する試験ストリップ検定に対する必要が存在する。

【0019】比色試験試験ストリップは、前記で考察した、ある種の酸-塩基指示薬と相互作用し、pHの変化なしに指示薬の色を変えるタンパク質の能力を利用する。例えば、指示薬テトラブロモフェノール・ブルー（TBPB）が緩衝されておよそ3の一定pHを維持する場合、試験パッドは、タンパク質を含有しない試験試料と接触すると黄色を保つ。しかしながら、タンパク質を含有する試験試料に関しては、タンパク質の存在は、緩衝された色素が試験試料中のタンパク質濃度によって、緑がかった黄色、緑色または青色のいずれかを試験パッドに呈することを起こす。結果として、乾相試験ストリップの試験パッド中の緑がかった黄色の発色は、痕跡量のタンパク質または陰性量のタンパク質として解釈される。

【0020】タンパク質検定に用いられるいくつかの比色試験ストリップは、テトラブロモフェノール・ブルーのような緩衝化pH指示色素で含浸した担体マトリックスの小さい方形パッドからなる単一試験領域を有する。その他の比色試験ストリップは、上記のようなタンパク質検定のための一つの試験領域または試験パッドを包含し、さらに同一のストリップ上にいくつかの付加的な試験パッドを包含してpHのようなその他の尿成分の同時検定を可能にする、複数測定因子試験ストリップである。

【0021】比色試験ストリップの両方のタイプについて、尿中タンパク質の検定は、単に比色試験ストリップをよく混合した非遠心処理尿試料中に浸漬し、次いで試験ストリップの試験パッドに結果として生じた色を、比色試験ストリップ容器に提供されている標準色チャートと比較することによって実施する。

【0022】pH3に緩衝されたテトラブロモフェノール・ブルーを指示色素として利用する試験ストリップについて、タンパク質の定量的検定を実施することができ、陰性、痕跡、あるいは1プラス～4プラスとして報告する。陰性の読み取りまたは黄色は、指示色素の色遷移の欠如によって明らかにされるように、尿が約15mg/dLより少ないタンパク質を含有することを示す。痕跡の読み取りまたは緑がかった黄色は、尿が約15～約30mg/dLのタンパク質を含有することを示す。1プラス～4プラスの読み取りは、緑色から次第に暗色化する青色の色遷移によって意味され、各々30、100、300、および2000mg/dLタンパク質より多い尿中タンパク質濃度におよそ等価であって、次第に重症のタンパク尿の信頼できる指標として役立つ。したがって、陰性検定（黄色）と痕跡検定（緑がかった黄色）との識別は、正確なタンパク質分析のために重要である。

【0023】上記の方法にしたがって、尿試料中のタンパク質含量が0mg/dL～約30mg/dLの範囲にあること

を、個人が容易に視覚的に測定できる。しかしながら、現在利用可能な市販の試験ストリップによって与えられる色識別は、約15mg/dLタンパク質（陰性）より少ない試料と約15～約30mg/dLタンパク質（痕跡）を含有する試料との間の尿タンパク質含量の正確な測定を可能にするには不十分である。低尿タンパク質濃度間を識別することの不可能は、健康人が通常約2mg/dL～約20mg/dLの範囲の尿タンパク質レベルを有するので、臨床的に重要である。したがって、個体の尿タンパク質含量を正確に測定することは、タンパク質含量を約30mg/dLより少ないある値に単に見積もることよりむしろ臨床的に重要である。

【0024】尿タンパク質に関する痕跡の読み取りは、陽性検定と考えられ、陽性試験ストリップ読み取りの確認が必要である。試験ストリップ陽性タンパク質検定を確認する普及している方法は、SSAと略される比濁スルホサリチル酸法である。高頻度の擬陽性検定は、各々の擬陽性検定について確認試験を必要とし、付帯的な費用が加算される。したがって、試験ストリップ検定のようなタンパク質に関するスクリーニング試験は、低頻度の擬陽性読み取りを提供することが重要である。

【0025】痕跡タンパク尿は、正常尿タンパクより少し多いタンパク質排出として定義される。タンパク質の正常な排出は、50～150mg/24時間、および妊娠中は200～300mg/24時間である。1250ml/24時間の平均尿容積を用いて、4～12mg/dL（妊娠中16～20mg/dL）の濃度単位と計算される。24時間尿容積は約700ml～2000mlより多くまで変化する。正常タンパク質の範囲はかなり広く、予想されるように、より高い比重（SG）を有するより濃縮された試料はより多くのタンパク質を含有する。してみれば、痕跡タンパク尿は、陰性と1プラス（30mg/dL）との間に入るタンパク質濃度である。しかしながら、正常タンパク尿がある範囲のタンパク質濃度をカバーするので、痕跡タンパク尿も又ある範囲のタンパク質濃度をカバーする。痕跡タンパク質濃度は、試料の比重、即ちSGにもまた依存する。

【0026】SGに伴うタンパク質濃度の変異は、確認SSA検定に影響せず、したがって、SSA検定におけるタンパク質沈殿は臨床的タンパク尿の指標と考えられる。しかしながら、SSA法は定性的方法であり、臨床実験室間で手順が変わるので、SSA法もまた限界を有する。したがって、乾相試験ストリップのようなスクリーニング試験で提供されるタンパク質に関する痕跡読み取りに伴う問題は、読み取りが、臨床試料についてよく定義されていない；試料のSGに依存する；正常、即ち陰性タンパク質範囲と重複する；タンパク質範囲に対応しなければならないことである。さらに、標準化されていないが、しかし容易で計器を何ら必要としないために当業界で選択され、正常タンパク質の存在下で臨床的タ

ンパク尿を検出する定性的方法によって、痕跡読み取りは、通常、陽性として確認される。

【0027】もちろん、尿試料のタンパク質含量は、定量的な24時間タンパク質沈殿技術によってより正確に測定され得る。しかしながら、これらの試験は、時間がかかり、比較的高価である。さらに、沈殿試験は、訓練された職員によって実験室で実施しなければならない、したがって、患者が家庭で尿タンパク質含量を迅速に測定し、特定の医療の成功または失敗を監視するためには利用できない。

【0028】したがって、0mg/dL ~ 約15mg/dL および約15mg/dL ~ 約30mg/dL の範囲間、ならびに上に向かって約100mg/dL ~ 約300mg/dL までの範囲のタンパク質レベル間の視覚的識別を可能にする、タンパク質含量に関して尿を検定する簡単、正確で、信頼に値する方法を有することは、非常に有利である。尿タンパク質濃度を測定するこのような正確な方法を、浸漬-読み取り(dip-and-read)試験ストリップのような用い易い形態で提供することによって、検定結果を一日まで待たねばならないことなしに診断が下され、医療が即時に開始されるように、実験室職員によって即時の結果を与えるために尿検定を実施し得る。

【0029】さらに、試験ストリップ法は、不必要で時間と費用がかかる確認試験を必要とする多数の擬陽性検定を提供することなしに、より正確に低レベルの尿タンパク質を監視し、患者が受けている医療の成功を監視するために、患者によって家庭で実施され得る。最後に、タンパク質検定に用いられる方法および組成物は、正確なタンパク質検定を提供するためには、尿の比重に依存してはならない。

【0030】例えば、現在の尿タンパク質試験ストリップは、オクタハロスルホフタレインタンパク質指示薬、例えばテトラブロモフェノール・ブルー(TBPB)を指示色素として含有する。これらのストリップを低~中程度の比重の、例えば1.020より低いSGの、アルブミンを含まない尿試料に浸漬すると、ストリップは黄色がかった緑色になる。同一のストリップをアルブミンを含まない高SG、例えば1.020以上のSGの尿試料に浸漬すると、ストリップは緑がかった黄色になる。この緑がかった黄色は、臨床的に有意のアルブミンの痕跡濃度(10~15mg/dL)として、容易に不正に解釈され得る。しかしながら、低SG尿試料を用いてさえ、真の痕跡色から陰性色を識別することは困難である。

【0031】本明細書中により十分に後述するように、本発明の方法は、新規で改良された指示試薬組成物を包含する担体マトリックスを含む試験パッドを有する試験ストリップを利用することによって、早くて正確な、信頼に値する尿タンパク質検定を可能にする。驚くべきことに、そして予期せぬことに、本発明の指示試薬組成物は、陰性~痕跡量のタンパク質を含有する尿試料の検定

に対する比重の干渉的影響を事実上排除する。

【0032】本発明の新規で改良された指示試薬組成物は、陰性量のアルブミンを含有する高SG試験試料による干渉的な緑がかった黄色の発色を事実上排除することによって、視覚的色解像を強化する。したがって、検定の感度は強化され、尿タンパク質濃度を約30mg/dL以下のレベルで正確に測定し、アルブミンに関する擬陽性スクリーニング検定から生じる費用のかかる確認試験を排除することを可能にする。さらに、本発明の方法は、試験試料中のより高い濃度のタンパク質の存在または濃度、例えば約100mg/dL ~ 約2000mg/dLを測定するために用いることもできる。

【0033】異常に高いアルブミンレベルに起因するタンパク尿は、臨床的および病理学的障害の正確な性質ならびに特定の疾病の重症度に依存する。タンパク尿は、間欠性または連続性、あるいは腎臓障害というよりむしろ生理学的または機能的状態によって起こる一時的間欠性タンパク尿であり得る。したがって、タンパク質に関する尿またはその他の試験試料の正確な検定は、実験室と家庭の両方での使用に利用可能でなければならない。検定は、正しい診断が下され、正しい医療が行なわれ、監視され、維持されるように、目的のタンパク質の検出または測定を可能にしなければならない。さらに、尿またはその他の試験試料中のタンパク質の容易、経済的、定量的もしくは定性的な測定のために、浸漬-読み取り形式でタンパク質検定法を利用し得るのであれば有利であろう。

【0034】さらに、尿またはその他の試験試料中のタンパク質に関するいかなる検定方法も、pH変化またはタンパク質以外の試験試料成分との優先的な相互作用のような競合する化学的または物理的相互作用の結果としてではなく、指示試薬組成物とタンパク質との間の相互作用の結果として検出可能または測定可能な色遷移を提供する方法を利用することによって、正確で信頼に値する、再現性のよい結果を生じなければならない。

【0035】さらに、タンパク質検定法が、迅速、経済的、そして正確な尿およびその他の試験試料中のタンパク質の測定のための乾相試験ストリップにおける使用に好適であるならば、有利であろう。加えて、タンパク質に関する検定に利用され、担体マトリックスおよび指示試薬組成物を含む方法および試験パッド、ならびに新規の指示試薬組成物は、複数測定因子試験パッドストリップ上に存在するその他の試験試薬パッドに悪影響を及ぼしたり、干渉するべきではない。

【0036】色素、例えば、テトラブロモフェノール・ブルーまたはテトラクロロフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロモスルホフタレインを利用する乾相化学試験ストリップは数年の間広範に用いられてきたが、どの乾相試験ストリップも、前記一般式(1)に示した疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を均一に包含



する濾紙のような担体マトリックスを含む試験パッドを利用しなかった。

【0037】指示試薬組成物は、尿タンパク質に反応し、事実上尿比重に依存しないので、それにより陰性量のタンパク質を含有する高SG試料による試験パッド中の緑がかった黄色の発色を排除する。したがって、検定は、特に低めのタンパク質濃度レベルで改良された視覚的色解像および増加した検定感度を示し、実質的に擬陽性検定の数を減少する。驚くべきことに、および予期せぬことに、尿比重に関連する干渉の事実上の排除のために、本発明の方法は、アルブミンに関する尿およびその他の試験試料の乾相試験ストリップ検定を、特に0mg/dL～30mg/dLのアルブミンレベルで促進する。

【0038】従来技術は、タンパク質に関して尿を検定するpH指示色素法において用いられる湿相および乾相化学に関する多数の引用文献を含む。例えば、Kestonの米国特許第3,485,587号は、一定pHでのタンパク質に関する検定に用いられる基本的な色素結合技術を開示する。Kestonは、その色素の $pK_a$ （酸解離定数）より少し低い一定pHに維持され、濾紙のような乾試験紙に包含された単一の指示色素を利用し、その色素の色遷移を監視することによってアルブミンの存在または濃度を測定することを教示する。

【0039】Free et al. もまた、米国特許第3,095,277号において、未処理濾紙のような吸水性担体に好適な指示組成物を包含させることによって、液体試験試料のアルブミン含量を測定する方法を開示する。

【0040】同様に、Atkinson et al. は、米国特許第3,438,737号において、液体中のタンパク質の検出のための、吸水性マトリックス、例えば、濾紙、木材ストリップ、合成プラスチック繊維材、不織布および織布に包含させた試験組成物を含む試験具を開示する。

【0041】Rittersdorf et al. は、米国特許第4,013,416号において、吸収性担体にオクタハロスルホフタレインpH指示色素、緩衝剤および約500～約10,000ダルトンの分子量を有する水不溶性ポリプロピレングリコールを包含させた試験ストリップを開示する。Rittersdorf et al. は、水不溶性ポリプロピレングリコールが医薬品の代謝物のような窒素含有化合物と指示色素との反応性を減少し、それにより試験ストリップ中のブランク反応を減少することを教示する。Rittersdorf et al. はまた、水不溶性ポリプロピレングリコールが有用であることのみを教示し、例えば、ポリエチレングリコールは有用ではない。Rittersdorf et al. は、懸垂ポリオキシアルキレン単位を含有する炭化水素または本質的炭化水素骨格を含むポリマーの有用性を教示しない。

【0042】これに対して、本発明の指示試薬組成物は、メチレン基または酸素基で連結された、ノニルフェノールのような1～約8個のアルキルフェノール単位を含有する炭化水素骨格または本質的炭化水素骨格を有す

る疎水性高分子化合物を含有する。ここで、各アルキルフェノール単位のフェノール部分は、エトキシ化および/またはプロポキシ化されて、全部で約2および約20までのエトキシおよび/またはプロポキシ単位を含有する。

【0043】上記に引用した引用文献は、前記一般式(1)で示された疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物が、タンパク質のような試験試料中の分析対象物量のより正確な測定を、特に低分析対象物量で達成するために、診断具に用いられ得ることを、単独または組み合わせで教示または示唆しない。これらの引用文献は、このような指示試薬組成物が、尿タンパク質に関する検定における尿比重の影響を事実上排除することによって、アルブミンに関する擬陽性検定の数を実質的に減少することをもた、単独または組み合わせで教示または示唆しない。

【0044】従来技術とは対照的に、および現在利用可能な市販試験ストリップとは対照的に、本発明の方法は、液体試験試料中、例えば、尿のような生体液中のタンパク質の検出および測定における増加した感度を提供し、驚くべきことに、および予期せぬことに、担体マトリックスに均一に包含された指示色素、緩衝剤および一般式(1)で示された疎水性高分子化合物を含む指示試薬組成物を利用することによって、陰性量（例えば、約15mg/dL未満）のタンパク質を含有する試験試料の検定を、痕跡量（例えば、約15～約30mg/dL）のタンパク質を含有する試験試料の検定からより正確に識別し得る。したがって、擬陽性検定の数は実質的に減少され、不必要で費用のかかる確認検定の数もまた減少される。

【0045】それ故、本発明の方法に従えば、指示色素、緩衝剤および一般式(1)の疎水性高分子化合物を含む指示試薬組成物を均一に包含した担体マトリックスを含み、陰性～低痕跡量のタンパク質を含有する試料に関する正確なタンパク質検定を提供し、試験試料の比重に依存しない試験パッドを利用することによって、タンパク質に関する尿およびその他の試験試料の乾相試験ストリップ検定において、新規で予期せぬ結果が達成される。

【0046】

【課題を解決するための手段】手短には、本発明は試験試料中の成分、特に陰性～痕跡量の成分の存在または濃度を測定するための新規で改良された方法、試験具および組成物に向けられている。本方法は、試験試料成分と相互作用し、検出可能な応答を生じることのできる指示試薬組成物を用いることを含む。家庭での使用には、指示試薬組成物は視覚的に検出可能な応答を生じる。実験室での使用には、指示試薬組成物は視覚的にまたは計器によって検出可能な応答を生じる。

【0047】本方法は、指示試薬組成物を分析対象物検

出具の担体マトリックスに包含する乾相検定に好適である。分析対象物検出具の担体マトリックスは、濾紙のような吸水性材料、あるいは非吸水性多孔質材料、例えば、透過性ストリップまたは高分子物質の層もしくは膜を含む。指示試薬組成物は、担体マトリックスに均一に包含され、次いで担体マトリックスは、既知の濃度で担体マトリックス中に指示試薬組成物を保持し、一方では、液体試験試料の浸透可能性を維持する。

【0048】より詳細には、本発明は、新規で改良された指示試薬組成物を利用することによる、タンパク質、特に陰性～痕跡量のタンパク質に関する尿またはその他の試験試料の検定の方法に向けられている。

【0049】指示色素、緩衝剤および一般式(1)で示される疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を用いることが、低タンパク質濃度において十分に増加した感度および十分な色解像を与えて、液体試験試料中の陰性量、例えば約15mg/dL未満のタンパク質と痕跡量、例えば約15～約30mg/dLのタンパク質との間の識別を可能にすることが立証された。検定結果は、事実上試験試料の比重に依存しない。本発明の重要な特徴に従えば、尿およびその他の試験試料中の0mg/dLと約2000mg/dLとの間、特に0mg/dLと約30mg/dLの間のタンパク質レベルの定性的および定量的測定が達成される。

【0050】本発明の指示試薬組成物を臨床試験法に利用することによって、尿またはその他の試験試料中のアルブミンのようなタンパク質の定性的または定量的濃度を、特に陰性～痕跡濃度のタンパク質で正確に測定し得る。これは、指示試薬組成物の応答が試験試料の比重に依存しないためである。驚くべきことに、および予期せぬことに、分析対象物検出具に包含された指示試薬組成物は、1.005～約1.030の範囲の比重を有する尿およびその他の試験試料中の陰性タンパク質濃度と痕跡タンパク質濃度との間の識別を可能にし、それにより尿中タンパク質に関する擬陽性検定の数に有意に減少する。

【0051】したがって、本発明の一つの側面は、液体中の化学化合物の相対的濃度の測定のための、新規で改良された試験具、方法および組成物を提供することである。

【0052】本発明の別の側面は、タンパク質、特に30mg/dL以下の濃度でのタンパク質に関する、尿またはその他の試験試料の検定の、簡単、正確で、再現性のよい方法を提供することである。

【0053】本発明の別の側面は、試験液体中のタンパク質と相互作用して、試験試料中のタンパク質濃度の指標である、試験具の色変化のような視覚的な変化を生じるための新規で改良されたタンパク質相互作用性試験具を提供することである。

【0054】本発明の別の側面は、陰性および痕跡タン

パク質濃度間の識別を可能にするのに十分な感度および十分な視覚的色解像を有する、尿またはその他の液体試験試料の検定方法を提供することである。

【0055】本発明の別の重要な側面は、約30mg/dL以下のタンパク質濃度に感受性であり、0mg/dL～約2000mg/dLのタンパク質レベル間、特に0mg/dL～約30mg/dL間を定量的に区別する、尿またはその他の液体試験試料の検定方法を提供することである。

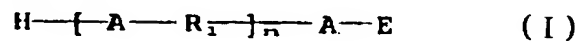
【0056】本発明の別の側面は、タンパク質と相互作用し、検出可能および測定可能な色遷移を起こして、試験試料中のタンパク質の存在および濃度を確立する指示試薬組成物を利用する、尿またはその他の液体試験試料の検定方法を提供することである。

【0057】本発明の別の側面は、タンパク質と相互作用し、視覚的にまたは計器によって識別可能な色遷移を起こして、0mg/dLと約2000mg/dLとの間、特に0mg/dLと約30mg/dLの間のレベルで、尿またはその他の試験試料中のタンパク質の濃度の定量的な測定を可能にする指示試薬組成物を提供することである。

【0058】本発明の別の側面は、アルブミンと相互作用し、色変化を起こすことができる指示試薬組成物を提供することであって、この指示試薬組成物は、(a)指示色素；(b)緩衝剤；(c)以下の一般式(1)：

【0059】

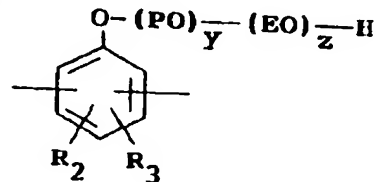
【化11】



【0060】(式中、Aは

【0061】

【化12】



【0062】であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0～約20の範囲の数、zは0～約20の範囲の数、y+zの合計は約2～約20の範囲の数、ならびにR2およびR3は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R1はメチレンまたは酸素であり；nは1～約8の範囲の数であり；そして、Eは、R1がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR1が酸素の場合、ヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物；および(d)水を含む好適な担体を含む。

【0063】本発明の別の重要な側面は、アルブミンと相互作用して、色変化を起こすことができ、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物

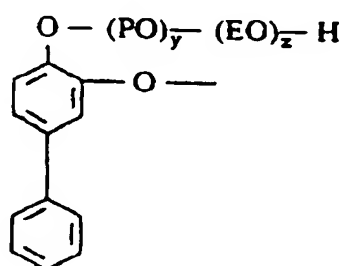


を提供することであって、この場合、 $R_2$  および  $R_3$  は、独立して、水素、1～約22個の炭素原子を含有するアルキル基、 $\alpha$ -メチルスチリルおよびフェニルより成る群から選択される；あるいは、この場合、一般式

(1) の疎水性高分子化合物の  $-A-R_1-$  部分は以下のものより成る群から選択される。

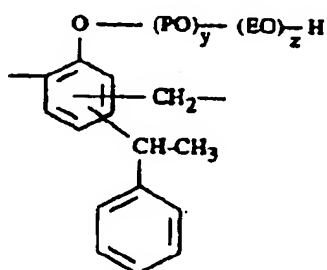
【0064】

【化13】



【0065】

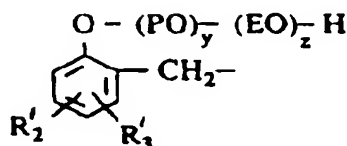
【化14】



【0066】および

【0067】

【化15】

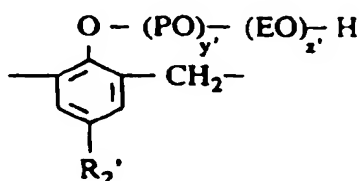


【0068】(式中、 $R_2'$  および  $R_3'$  は、それぞれ、水素または1～約22個の炭素原子を含有するアルキル基である)

【0069】本発明の別の重要な側面は、タンパク質の検定のための、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を提供することであって、この場合、 $n$ は約2～約5の範囲の数であり、および/またはこの場合、疎水性高分子化合物の  $-A-R_1-$  部分は

【0070】

【化16】



【0071】(式中、 $y'$  および  $z'$  は、それぞれ、約2～約8の範囲の数、特に約5～約6であり； $y' + z'$  の合計は約6～約16の範囲の数、特に、約10～約12であり；および  $R_2'$  は約6～約18個、特に約7～約12個の炭素原子を含有する、直鎖状または分枝状のアルキル基である)である。本発明の十分な利点を達成するためには、 $R_2'$  は、 $\text{C}_9\text{H}_{19}$ アルキル基のような約8～約10個の炭素原子を含有するアルキル基である。

【0072】本発明の別の側面は、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を乾相分析対象物検出に包含させることによって、タンパク質に関する検定法を提供することである。

【0073】本発明のさらに別の側面は、試験試料中のタンパク質含量と相互作用することのできる指示試薬組成物を包含した担体マトリックスを有する分析対象物試験具を利用することによって、タンパク質に関する新規で改良された検定法を提供することである。この場合、担体マトリックスは、濾紙のような吸水性マトリックス、あるいは非吸水性マトリックス、例えば、透過性高分子物質の層、フィルムまたは膜を含む。

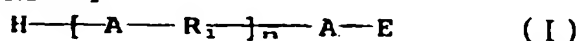
【0074】本発明の上記のおよびその他の側面および利点ならびに新規の特徴は、以下の本発明の指示試薬組成物を含有する試験ストリップのタンパク質に対する増加した感度、それによりより正確で識別可能な分析対象物測定を可能にすることを明らかにする添付図面に説明される本発明の好ましい態様の詳細な記載から明らかになるであろう。

【0075】図1は、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を包含する試験ストリップを、疎水性高分子化合物を含有しない指示試薬組成物を包含する試験ストリップと比較する、630nmでのアルブミン濃度(mg/dL)対Kubelka-Munk関数( $K/S$ )の用量-反応プロットである。

【0076】本発明にしたがえば、尿およびその他の液体試験試料中のアルブミンのようなタンパク質、特に陰性～痕跡濃度のタンパク質に関する定性的または定量的検定が、(a)指示色素；(b)緩衝剤；(c)以下の一般式(1)：

【0077】

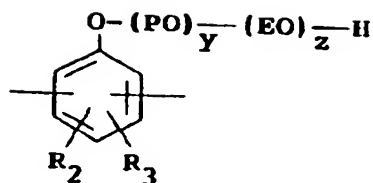
【化17】



【0078】(式中、 $A$ は

【0079】

【化18】

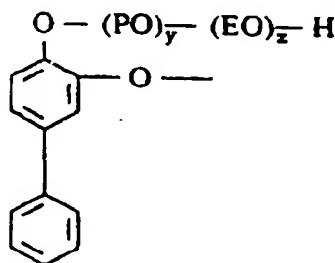


【0080】であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、 $y$ は0～約20の範囲の数、 $z$ は0～約20の範囲の数、 $y+z$ の合計は約2～約20の範囲の数、ならびに $R_2$ および $R_3$ は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され； $R_1$ はメチレンまたは酸素； $n$ は1～約8の範囲の数；そして、Eは、 $R_1$ がメチレンの場合、Eは水素またはメチロールであるか、あるいは $R_1$ が酸素の場合、ヒドロキシである）で示される疎水性高分子化合物；および（d）水を含む好適な担体；を含む指示試薬組成物を利用することによって達成される。

【0081】好ましくは、 $R_2$ および $R_3$ は、独立して、水素、1～約22個の炭素原子を含有する直鎖状または分枝状のアルキル基、 $\alpha$ -メチルスチリルまたはフェニルである。さらに、この-A- $R_1$ -部分は、好ましくは、

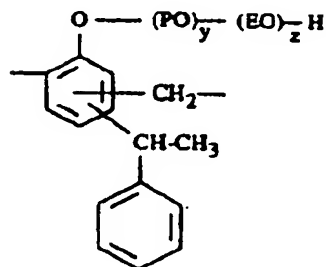
【0082】

【化19】



【0083】

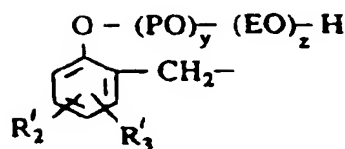
【化20】



【0084】または

【0085】

【化21】

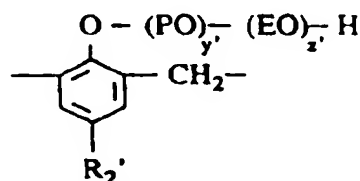


【0086】（式中、 $R_2'$ および $R_3'$ は、独立して、水素またはアルキル基である）である。

【0087】本発明の十分な利点を達成するためには、一般式（1）の疎水性高分子化合物は、以下の構造を有する-A- $R_1$ -部分を含有する。

【0088】

【化22】



【0089】（式中、 $y'$ および $z'$ は、それぞれ約2～約8の範囲の数、好ましくは約5～約6であり； $y'+z'$ の合計は約6～約16の範囲の数、好ましくは約10～約12であり； $R_2'$ は約6～約18個、好ましくは約7～約12個の炭素原子を含有する、直鎖状または分枝状のアルキル基であり；および/または $n$ は約2～約5の範囲の数である）

特に有用な態様においては、 $R_2'$ は、ノニルアルキル基（C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>）である。

【0090】一般式（1）の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を用いることによって、検定は、タンパク質に対する十分な感度およびタンパク質レベル間の十分な視覚的色解像を達成し、液体試験試料中の陰性および痕跡濃度レベルのタンパク質間の識別を可能にする。本発明の方法によって与えられる低タンパク質レベルに対する改良された感度および色解像は、0～約30 mg/dL タンパク質を含有する試験試料の尿検定において特に有用である。これは、尿中の痕跡量のタンパク質に関する擬陽性検定の数を実質的に減少されるためである。

【0091】現在の市販の検定は、0 mg/dL ～約30 mg/dL の範囲のタンパク質濃度間、特に15 mg/dL より少ないタンパク質を含有する試験試料（陰性検定）と約15～約30 mg/dL タンパク質（痕跡量のタンパク質）を含有する試験試料とを有効に識別しない。0 mg/dL ～約15 mg/dL の範囲は健康人にとって正常な尿タンパク質レベルと見なされるため、低タンパク質濃度間を識別することは、当業界において重要である。したがって、0 mg/dL ～約15 mg/dL の尿タンパク質レベルは、臨床的には陰性の結果である。15 mg/dL より多い、そして約30 mg/dL までの尿タンパク質レベルは、疾病状態を示す臨床的に有意の痕跡量のタンパク質である。スクリー

ニング検定で痕跡量の尿タンパク質が発見されると、検定は、異なる検定法によって確認される。

【0092】したがって、不必要で費用のかかる確認検定の実施を回避するために、擬陽性検定の数を最少にする尿タンパク質検定を提供することが重要である。以下のこともまた注意されるべきである。即ち、比較的高い範囲、例えば、約30mg/dL～約2000mg/dLにおける尿タンパク質濃度に関してもなお、本発明の方法は尿タンパク質濃度に対する改良された感度および色解像を与えるが、しかしながら、このような高タンパク質レベルはさらに検査しなければならない異常な生理学的状態の決定的指標であるので、このような臨床的利点は、この濃度範囲においてはさほど重大ではない。

【0093】現在、尿試料は、乾相試験ストリップを尿に接触させることによって、過剰なタンパク質の存在に関してスクリーニングされる。試験ストリップは、試験試料中のタンパク質濃度に応答して検出可能な変化を起こす指示組成物を包含した試験パッドを含有する。一般試験パッドは、オクタハロスルホフタレイン指示色素、緩衝剤および任意の成分、例えば、バックグラウンド色素、界面活性剤および色安定剤を含有する指示組成物を包含する。

【0094】この一般試験ストリップは、アルブミンのみを検出する。しかしながら、アルブミン排出は総タンパク質排出と相関するため、試験ストリップは優れた総尿タンパク質検定を提供する。一般試験ストリップは、標準化アルブミン試料から決定された6つの標準色ブロックと共に包装されている。色チャートは、異なるタンパク質濃度に対応し、尿タンパク質に関する迅速な検定を提供する。

【0095】色チャートは、尿タンパク質に関する6つの濃度範囲を提供する；臨床的に正常範囲の陰性（15mg/dL未満）、痕跡範囲（約15～約30mg/dL）、ならびに病理学的範囲の30、100、300、および2000mg/dL。範囲全体にわたって生じる色変化は、黄色～黄色がかった緑色～緑色～青色である。陰性範囲～痕跡範囲では、色変化は緑がかった黄色～明緑色である。このような色変化は、検定者が視覚的に識別するのは困難である。

【0096】色変化が尿中の痕跡量のタンパク質を示すと解釈される場合、尿の確認検定が必要である。したがって、陰性検定と痕跡検定との間の色識別が乏しいために、試験ストリップがより多数の擬陽性検定を提供する場合、時間と費用のかかるより多数の確認検定が無用を実施されるであろう。しかしながら、陰性検定と痕跡検定との間に決定的な色識別を与える方法および組成物を提供することは、特に陰性検定が正常量の尿タンパク質と相関するために、そしてタンパク質濃度は高比重を有する尿においてより高いために、困難であった。

【0097】高タンパク質濃度、例えば、約100mg/d

L以上を有する尿試料については、高比重および低比重尿試料に関する色変化は、本質的に同一である。しかしながら、比重の影響は、約30mg/dLまでのタンパク質を含有する試料の検定において観察される。例えば、臨床的に陰性量のタンパク質を含有する高比重尿試料は、臨床的に有意量のタンパク質を含有する低比重尿試料の色変化と密接に調和する色変化を提供する。したがって、陰性高比重尿の検定は、臨床的に有意量のタンパク質を含有するとして、不正に解釈され得る。次いで、高比重尿は、SSA法のような確認検定法によって検定され、確認検定は尿中に臨床的に有意量のタンパク質を見出さないであろう。したがって、アルブミンに関する擬陽性スクリーニング試験は、無用な確認検定の実施を起こす。

【0098】陰性量のタンパク質を含有する高比重（SG）尿試料の検定の、痕跡量のタンパク質を含有する試料の検定で示される色への色転置は、陽性SG干渉と呼ばれる。この干渉は、現在の試験ストリップによって提供される擬陽性読み取りの源である。高SG尿試料による陽性干渉は少なくとも2つの因子、即ち試験試料中の第四級アンモニウム化合物の存在および試験試料の緩衝容量によって起されると理論付けられている。第四級アンモニウム化合物としては、正常タンパク質、ペプチド、アミノ酸およびクレアチニンが挙げられる。これらの尿成分全ての濃度が、比重の増加に伴って増加する。陽性SG干渉を起こす別の因子は、高SG尿試料の緩衝容量、特にpHを0.1単位まで上にシフトするホスフェートである。

【0099】さらに、高SG尿試料は、痕跡およびそれ以上の陽性タンパク質レベルで指示試薬組成物に対して減少した反応性を示す。尿タンパク質検定の用量-反応プロットは、低SG尿試料についてよりも高SG尿試料について低い傾きを表わす。それ故、異なる色ブロック間の色識別は、SGの上昇につれてより困難になり、陰性SG干渉と呼ばれる。この色識別の減少は、特に痕跡～30mg/dLの濃度範囲において、擬陽性検定を提供する。したがって、陽性の結果のみが確認されるので、検定者は擬陽性検定のみを自覚する。検定者は、擬陰性試験ストリップ読み取りを自覚しない。したがって、0～30mg/dLの範囲の正確なタンパク質検定を達成するためには、尿試料の検定におけるパラメーターとしての、尿試験試料の比重を排除することが必要である。

【0100】さらに、尿の検定に加えて、本発明の方法および組成物は、血清または血漿中のアルブミンの存在または定量的濃度；およびより一般的に、その他の多くのアルブミン含有液のアルブミン含量を測定するために用い得ることが明らかになるであろう。本発明の別の重要な特徴に従えば、本発明の方法および組成物は、尿またはその他の液体試験試料中のタンパク質、特に陰性～痕跡濃度のタンパク質の存在または濃度を測定するため

の、乾相の試験パッド検定において用い得る。

【0101】驚くべきことに、および予期せぬことに、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物は、試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定するための色素結合技術において用いる場合、改良された感度および視覚的色解像を明らかにした。指示試薬組成物中に一般式(1)の疎水性高分子化合物を用いる色素結合技術は、特に陰性～痕跡濃度のタンパク質に関して、より正確で信頼に値する、臨床的に有意の検定を提供する。

【0102】好適な担体マトリックスに包含された本発明の指示試薬組成物を含む試験パッドは、試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定するための色素結合技術において用いる場合、低タンパク質濃度に対する改良された色解像および増加した感度を明らかにした。好適な担体マトリックスに包含された本発明の指示試薬組成物を用いる色素結合技術は、0～約30mg/dLの範囲のタンパク質に関して、より正確で信頼に値する、臨床的に有意の定量的検定を提供する。

【0103】タンパク質に関する現在の検定法に用いられる指示試薬組成物は、正しい一定pHに維持される場合、タンパク質と相互作用し、タンパク誤差現象による色遷移を起こす。タンパク誤差現象は、Free et al. の米国特許第3,095,277号; Atkinson et al. の米国特許第3,438,737号; およびKestonの米国特許第3,485,587号に十分に記載されており、ここで、タンパク誤差現象を観察するために必要な種々の色素、正しいpH範囲、緩衝剤および担体マトリックス、例えば、濾紙のような吸水性物質が開示されている。

【0104】上記に示した3つの特許は、現在の、尿中の総タンパク質含量に関する検定に用いられる乾相試験ストリップを基本的に記載する。これらの総タンパク質試験ストリップは、通常pH5以下の強酸性で色遷移を起こす指示色素および指示色素のpHをその色遷移のpHより少し低く維持する緩衝剤を含む指示試薬組成物を一般的に含有する。指示色素の十分な緩衝は、色素が試験試料との接触の際に起こるpH変化よりもタンパク質との相互作用によって色を変化することを、本質的に保証する。現在の総タンパク質試験ストリップは、さらに、指示試薬組成物の包含のための担体マトリックス、例えば、処理または未処理濾紙を含有する。

【0105】本発明の重要な特徴に従えば、担体マトリックスは、好適な指示色素を含有する本発明の指示試薬組成物を包含する。好適な指示色素は、タンパク質と相互作用することができ、タンパク質との相互作用に際して、タンパク誤差現象による十分な色遷移を起こし、検出可能または測定可能な応答を与えることができる。しかしながら、本発明に従えば、一般式(1)の好適な疎水性高分子化合物を指示試薬組成物に包含させること

は、視覚的および計器による、指示色素とタンパク質との相互作用の際起こる色遷移の色解像および識別を、特に試験試料が0～約30mg/dLのタンパク質を含有する場合に実質的に改良することが見出された。したがって、タンパク質検定の感度は、特に陰性～痕跡範囲の低タンパク質濃度で増加し、尿タンパク質に関する擬陽性検定の数を実質的に減少する。

【0106】本発明の方法は、前記で考察した「タンパク誤差現象」を利用する。しかしながら、一般式(1)の好適な疎水性高分子化合物の、本発明の指示試薬組成物への包含は、色素-タンパク質相互作用により起こる色遷移の色解像および識別を改良する。前述したように、pH指示色素がタンパク質と相互作用する場合、色素の見掛けの $pK_a$ は変化し、いわゆる「タンパク誤差現象」を生じて色遷移が起こる。少しの色遷移、即ちバックグラウンド色は、試験試料が正常量のタンパク質を含有する、即ち陰性と検定される場合でさえ起こる。

【0107】バックグラウンド色の発色は、大部分が指示色素の陽性SG干渉への反応性によるものである。しかしながら、本発明の指示試薬組成物を用いることによって、発色は事実上試験試料の比重に依存しない。結果として、指示色素のタンパク質との相互作用の際の色解像および色識別は改良され、検定感度は増加し、そして擬陽性検定数は実質的に減少する。

【0108】本発明の指示試薬組成物は、陽性SG干渉を事実上排除することによって、アルブミン含有試料、特に30mg/dL以下のタンパク質を含有する試料のための改良されたタンパク質検定を提供することが明らかになった。したがって、陽性SG干渉を事実上排除することによって、タンパク質に関する陰性検定は、色空間の黄色領域に維持される。30mg/dL以下のアルブミンを含有する試験試料の検定に起因する色遷移の色解像および色識別は、したがって改良される。

【0109】一般に、その色素がタンパク質と相互作用し、タンパク質相互作用に応答して検出可能および測定可能な色遷移を起こすことができるのであれば、どんなpH指示色素でも本発明の組成物に利用し得る。このような指示色素は当業界で公知であり、尿またはその他の液体試験試料中のタンパク質の存在または濃度を測定するための方法において、指示試薬組成物に利用されている。

【0110】試験試料中のタンパク質の存在または濃度を正確に確立するために、指示色素に加えて、指示色素がpHシフトの結果として色を変化せず、しかしタンパク質と接触および相互作用すると色を変化するように、十分量の正しい緩衝剤をも、指示試薬組成物は必要とし得ることが知られている。さらに、種々の公知のタイプの緩衝剤のどれでも、指示試薬組成物に用い得ることが明らかになった。至適の結果のためには、指示試薬組成物のpHは、一般に指示試薬組成物の指示色素が色遷移を起

こすpH範囲の少しだけ下に維持されるべきであることもまた見出された。指示試薬組成物の特定の指示色素に関する好適な緩衝されたpH値を決定する、および指示試薬組成物に用い得る特定の緩衝剤を決定する方法は、Kestonの米国特許第3,485,587号に見出される。

【0111】さらに、指示試薬組成物に用いられる指示色素は、試験試料中の比較的低濃度のタンパク質が検出可能および測定可能な色遷移を生じるように、十分に強度のある色遷移を起こす。したがって、本発明の十分な利点を達成するためには、指示試薬組成物に用いられる指示色素は、色素がより強度のある色からより強度の少ない色へ、またはより強度の少ない色からより強度のある色へのいずれかの十分な色変化を起こすように、そして検定者が試験試料中のタンパク質含量を視覚的にまたは計器によって検出および測定し得るように、選択される。

【0112】本発明の組成物および方法において最も有利に用いられる指示色素は、オクタハロスルホフタレイン型またはオクタハロフェノールフタレイン型の色素、例えば、テトラブロモフェノール・ブルー、テトラクロロフェノール・ブルー、3',3'',5',5''-テトラヨード-3,4,5,6-テトラブロモフェノールスルホフタレイン、および3,3''-ジヨード-5,5'',3,4,5,6-ヘキサブロモフェノールスルホフタレインである。これらのオクタハロスルホフタレイン型およびオクタハロフェノールフタレイン型の色素は、タンパク質に結合後、試料中の陰性〜痕跡濃度のタンパク質を含め、試験試料のタンパク質含量の視覚的なまたは計器による検出および測定を可能にするのに十分な色遷移を起こすことができる。

【0113】いくつかの化学的および物理的パラメータ、例えば、タンパク質と相互作用する能力、試験試料の色、色遷移の強度および化学的適合性によって、特定のオクタハロスルホフタレイン型またはオクタハロフェノールフタレイン型の色素が、指示組成物の指示色素として選択される。一般に、指示色素は、約0.05〜約0.6mmol/組成物1リットルの量で指示試薬組成物中に存在する。しかしながら、指示色素は、用いられる特定の指示色素の色遷移の強度によって、より多いまたはより少ない量で存在し得る。

【0114】指示試薬組成物の指示色素として選択される厳密なオクタハロスルホフタレイン型色素またはオクタハロフェノールフタレイン型色素は、最大の色解像および最大の感度を有するタンパク質検定を生じるために、試験キットを企画する業界の技術者によって決定され得る。本発明の指示試薬組成物に利用されるオクタハロスルホフタレイン型色素またはオクタハロフェノールフタレイン型色素は、当業者には公知の方法によって調製し得る。さらに、本発明に方法に有用ないくつかの色素化合物は、現在商業的に利用可能な指示色素で

ある。

【0115】さらに、種々の公知のタイプの緩衝剤はどれでも、本発明の指示試薬組成物に用い得ることが明らかになった。緩衝剤の機能は、アルブミンの存在によって指示試薬組成物中の望ましい色変化を生じるために、およびアルブミン含有試料のpHの変異による色変化を本質的に排除するために、組成物を実質的に一定pHに維持することである。結果として、用いられる緩衝剤の量は、試験試料の性質に依存する。特定の場合にこの範囲より上または下であり得るが、緩衝剤の量は、通常、約250mMと750mM (mmol/l) の間に入る。

【0116】用いられる特定の緩衝剤の性質は、指示試薬組成物に包含される指示色素によって依存・変化する。しかしながら、至適の結果のためには、指示試薬組成物のpHは、指示色素が色遷移を起こすpH範囲より少しだけ低い値に維持されるべきであることが見出された。有用な緩衝剤としては、例えば以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：クエン酸、マレイン酸、酒石酸、フタル酸、スルホサリチル酸、コハク酸、およびマロン酸；これら各々のアルカリ金属およびアンモニウム塩；ならびに、その他の好適な緩衝剤またはその組み合わせは、当業界で公知のとおりである。組成物中に用いられる特定の指示色素および特定の緩衝剤のための正しいpHを決定する方法は、Kestonの米国特許第3,485,587号に見出される。

【0117】指示色素および緩衝剤に加えて、指示試薬組成物は、一般式(I)：

【0118】

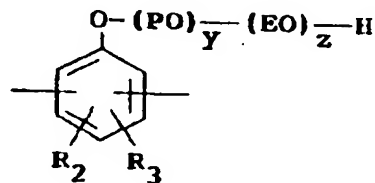
【化23】



【0119】(式中、Aは

【0120】

【化24】



【0121】であって、POはオキシプロピレン単位、EOはオキシエチレン単位、yは0〜約20の範囲の数、zは0〜約20の範囲の数、y+zの合計は約2〜約20の範囲の数、ならびにR2およびR3は、独立して、水素、アルキル基、アラルキル基およびアリール基より成る群から選択され；R1はメチレンまたは酸素；nは1〜約8の範囲の数であり；そして、Eは、R1がメチレンの場合、水素またはメチロールであるか、あるいはR1が酸素の場合、ヒドロキシである）を有する疎水性高分子化合物を含有する。

【0122】一般式(1)の疎水性高分子化合物は、約800～約12,000の、そして好ましくは、約1500～約8000の分子量を有する。一般式(1)で示される疎水性高分子化合物はバックグラウンド色の発色を減少し；タンパク質以外の尿成分による陽性干渉を減少し；および乾相試験ストリップ検定において擬陽性検定に導く高比重試料による陽性干渉を実質的に減少する。

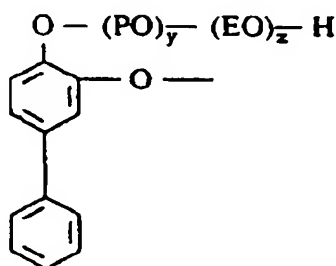
【0123】本明細書中で後により十分に考察されるように、指示試薬組成物1mlあたりの一般式(1)の疎水性高分子化合物の重量で約1%～約8%、好ましくは、約2%～約6%が、アルブミンを含まない高SG(比重)または低SG尿試料との接触後に明黄色のままである試験パッドを提供することが示された。

【0124】これに対して、一般式(1)の疎水性高分子化合物を欠いている試薬組成物を包含する試験パッドは、アルブミンを含まない高SG尿試料との接触後に緑がかった黄色に変色する。この黄色～緑がかった黄色への色遷移は、臨床的に有意の痕跡量のアルブミンとして不正に解釈され、それにより擬陽性検定を提供する。試験試料は、次いで、アルブミンに関する不必要で費用のかかる確認検定に掛けられるであろう。

【0125】一般式(1)の疎水性高分子化合物に関しては、好ましくは、 $R_2$  および  $R_3$  は、独立して、水素、1～約22個の炭素原子を含有する直鎖状または分枝状のアルキル基、 $\alpha$ -メチルスチリルまたはフェニルである。さらに、この-A- $R_1$ -部分は、好ましくは、

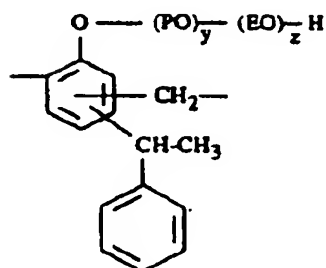
【0126】

【化25】



【0127】

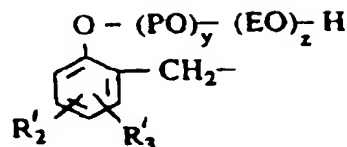
【化26】



【0128】または

【0129】

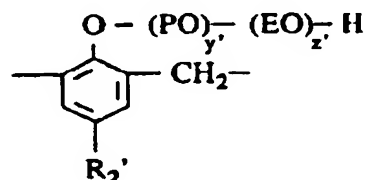
【化27】



【0130】(式中、 $R_2'$  および  $R_3'$  は、独立して、水素または1～約22個の炭素原子を含有するアルキル基である)である。本発明の十分な利点を達成するためには、一般式(1)の疎水性高分子化合物は、約2～約5の範囲の数nを有し、および/または以下の構造を有する-A- $R_1$ -部分を含有する。

【0131】

【化28】



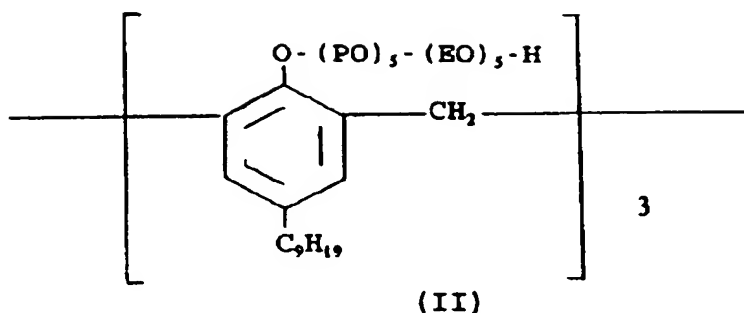
【0132】(式中、 $y'$  および  $z'$  は、独立して、約2～約8の範囲の数、好ましくは約5～約6であり； $y' + z'$  の合計は約6～約16の範囲の数、好ましくは約10～約12であり； $R_2'$  は約6～約18個、好ましくは約7～約12個の炭素原子を含有する、直鎖状または分枝状のアルキル基である)

【0133】特に有用な一般式(1)の疎水性高分子化合物を構造式(II)に示し、本明細書中これ以降はポリマーIIとして引用する。ポリマーIIは、約2200の分子量を有する。

【0134】

【化29】





【0135】必須成分に加えて、必須成分の性質または機能を実利的に変化させず、タンパク質に関する検定に干渉しないその他の随意の成分もまた指示試薬組成物中に含有し得る。例えば、指示試薬組成物は、場合によっては、試験具の試験パッドの試験試料湿潤を改良する化合物を含有し得る。随意的湿潤化合物は、通常、非イオン性界面活性剤である。オクトキシノール(octoxynol s)、ノンオキシノール(nonoxynols)およびエトキシ化脂肪アルコール(ethoxylated fatty alcohols)は、本発明の指示試薬組成物中の湿潤化合物として有用な非イオン性界面活性剤の非制限的な例である。湿潤化合物は、0 mM～約200 mMの濃度、好ましくは、約50 mM～約200 mMの濃度で指示試薬組成物中に含有し得る。

【0136】さらに、タンパク質に関する色原性検定における色解像および色遷移の識別を改良するために、指示試薬組成物中に不活性バックグラウンド色素を含有し得る。好適なバックグラウンド色素としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：エチルオレンジ(4-(4-ジエチルアミノフェニルアゾ)ベンゼンスルホン酸)；オレンジG(4-(2-ヒドロキシ(7,9-ナトリウムジスルホネート)-1-ナフチルアゾ)ベンゼン)；分散オレンジ11、13、または25；カルコミンオレンジ(calcomine orange)；メチルオレンジ；およびオレンジII(4-(2-ヒドロキシ-1-ナフチルアゾ)ベンゼンスルホン酸)、あるいはその組み合わせ。バックグラウンド色素は、0 mM～約2 mMの濃度、好ましくは、約0.1 mM～約1 mMの濃度で本発明の指示試薬組成物中に含有し得る。

【0137】指示試薬組成物中に含有される成分のための担体ビヒクルは、水を含む。しかしながら、指示試薬組成物中に含有される特定の成分の水溶解性が限られているために、有機溶媒、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、エチルアセテートおよび同様の溶媒を、水不溶性の成分を溶解するために用い得る。指示試薬組成物の担体ビヒクル中に含有するための好適な有機溶媒または有機溶媒の組み合わせの選択は、診断試験ストリップを企画する業界の当業者の能力の範囲内である。

【0138】さらに、指示試薬組成物は、一つは水性ベースのおよび一つは有機溶媒ベースの、それぞれ水溶性および水不溶性成分を溶解するための、二つの別個の溶液から構成され得ることは、理解されるべきである。このような場合、組成物中に存在する各々の成分の量は、二つの別個の溶液の総容積を用いて決定される。本明細書中で後により十分に明らかにされるように、担体マトリックスは、次いで二つの処理に掛けられ得る。したがって、指示試薬組成物の各々の必須成分を担体マトリックスに均一に包含させるために、第一の溶液、即ち水性または有機溶媒ベースのどちらかを担体マトリックスに包含させ、次いで第二の溶液を担体マトリックスに包含させる。

【0139】尿またはその他の試験試料との接触に際し、指示試薬組成物の色遷移はタンパク質の存在を明らかにする。さらに、色遷移の強度および度合いは、試験試料によって生じた色を既知の濃度のタンパク質を有する溶液によって生じた色と比較または相関することによって、試験試料中のタンパク質の定量的量を測定するために用い得る。本発明の重要な特徴に従えば、試験試料中の陰性～痕跡量のタンパク質を含め、タンパク質の量を、分光光度計または比色計のような色測定機器の使用なしに正確に測定し得るように、十分に解像され識別される色遷移を、本指示試薬組成物が提供することが明らかになった。しかしながら、望む場合には、このような色測定機器は、試験試料と既知のアルブミン濃度の溶液との間の、色の度合いおよび強度の差異を測定するために用い得る。さらに、検定は、事実上尿の比重に依存せず、それにより擬陽性検定の数を実質的に減少することが明らかになった。

【0140】したがって、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する本発明の指示試薬組成物を利用するタンパク質に関する検定は、検定の精度および信頼度を改良し、検定に対する医師の自信をも増加する。加えて、実験室の訓練された医師または技術者に対立するものとして、訓練されていない患者によって家庭で実施されるタンパク質に関する尿検定の数のために、尿の比重に起因する擬陽性検定の数減少するための、試料中の陰性～痕跡タンパク質含量に関する正確で信頼できる定量的検定法を提供することは肝要である。

【0141】一般に、タンパク質に関する検定は、酸性pHで色遷移を起こす指示色素を用いて、酸性pHで行う。これは、この指示色素が、酸性の、低いpH値でより強力にタンパク質と相互作用し得るためである。低pH値で指示色素とタンパク質との増加した相互作用が起こるのは、プラスに荷電した陽イオン性タンパク質分子と、マイナスに荷電した陰イオン性指示色素分子との間の強力な引力のため、およびそれに加えて、酸性条件がタンパク質を部分的に変性し、したがって指示色素と相互作用するタンパク質の能力を増加するのに役立つためである。したがって、本発明の指示試薬組成物は、一般に酸性pHに調整・維持される。一般に、本系のpHは、約2～約4の間に調整・維持され；本発明の十分な利点を達成するためには、pHは約3～4の間に調整・維持される。

【0142】本発明の指示試薬組成物を利用するアルブミンに関する乾相試験パッド検定は、当業界で公知の方法に従って実施する。一般に、アルブミン検定は、分析対象物検出を尿またはその他の試験試料に接触させることによって実施する。分析対象物検出は、指示試薬組成物を包含する試験パッドを含む。分析対象物検出は、尿または血清試料中に浸漬することができ、あるいは、尿または血清試料を分析対象物検出に滴下することができる。試験具の試験パッドの色変化は、アルブミンの存在を明らかにし、そのように企画されている場合には、色変化の強度および深度を色チャートと比較して、試験試料中のアルブミン濃度の定量的測定値を与え得る。

【0143】典型的には、分析対象物検出は、（単一の分析対象物に関する検定のための）単一パッド試験ストリップまたは（いくつかの分析対象物を同時に検定するための）複数パッド試験ストリップのどちらかとして企画された、試薬組成物を含浸した試験ストリップである。どちらのタイプの試薬含浸試験ストリップについても、試験ストリップは、支持ストリップまたは通常疎水性プラスチックで構築されたハンドル、および吸水性または非吸水性担体マトリックスを含む試薬試験パッドを含有する。一般に、担体マトリックスは、毛細管力に応じて試験試料がマトリックス中を移動して試薬組成物と接触し、検出可能および測定可能な色遷移を生じることが可能にする吸収性材料である。

【0144】担体マトリックスは、担体マトリックスが化学試薬に関して不活性である限りにおいて、目的の検定を実施するのに必要な化学試薬を包含することのできるあらゆる物質であり得る。担体マトリックスは、液体試験試料に関して、多孔質または吸収性でもある。

【0145】「担体マトリックス」という表現は、水およびその他の生理学的液体に不溶性で、水またはその他の生理学的液体に暴露された場合にその構造的完全性を維持する吸水性または非吸水性のマトリックスを引用する。

【0146】好適な吸水性マトリックスとしては、濾紙、スポンジ材、セルロース、木材、織布、不織布および同様のものが挙げられる。非吸水性マトリックスとしては、ガラス繊維、高分子フィルム、および形成（preformed）または微孔性（microporous）膜が挙げられる。その他の好適な担体マトリックスとしては、親水性無機粉末、例えば、シリカゲル、アルミナ、珪藻土等；泥質物質；クロス；親水性天然高分子物質、特にセルロースビーズのようなセルロース材、および特に濾紙またはクロマトグラフ紙のような繊維含有紙；合成または変形天然ポリマー、例えば、セルロースアセテート、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリウレタン、架橋デキストラン、アガロース、ならびにその他の架橋および非架橋水不溶性親水性ポリマーが挙げられる。

【0147】非吸収性物質は、本発明の担体マトリックスとしての使用に好適ではない。しかしながら、硬質の多孔質プラスチックは、試験試料がプラスチックに浸透して指示試薬組成物に接触することを可能にするのに十分にプラスチックが多孔質である限りにおいて、担体マトリックスとして有用である。担体マトリックスは、異なる化学組成物または化学組成物の混合物であり得る。マトリックスは、硬質性および軟質性と組み合わせられる平滑性および粗面性において変化し得る。

【0148】ハンドルは、通常、疎水性材料、例えば、セルロースアセテート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートまたはポリスチレンで形成され、担体マトリックスは、最も有利には、吸水性濾紙または非吸水性透過性高分子フィルムから構築される。

【0149】本発明の十分な利点を達成するためには、指示試薬組成物は、好適な担体マトリックスに均一に包含させ、試験試料中のタンパク質の検定のための乾相試験ストリップにおいて利用する。本発明の方法は、家庭または実験室において実施され得る、試験試料中のタンパク質の総濃度に関する経済的で、正確および信頼できる検定を与える。さらに、本発明の方法は、事実上試験試料の比重に依存せず、試験試料中の陰性および痕跡タンパク質濃度の検出および識別を可能にし、それにより検定を臨床的により有用にする。

【0150】本発明の方法に従えば、タンパク質に関する乾相試験ストリップ検定を実施するためには、約250mM～約750mMの総濃度のクエン酸カリウムのような緩衝剤を含有し、約3.5のpHに調整された水性溶液を最初に調製する。次いで、吸水性マトリックス、例えば、Whatman Ltd., Maidstone, Kent, U.K. から商業的に利用可能なWHATMAN CCP500濾紙のような濾紙を、展延、浸漬、または濾紙のシートもしくは予め切断したストリップに水性溶液を噴霧することによって、緩衝剤を含有する水性溶液で飽和する。水性溶媒は、空気炉中で約50℃で約20分間、炉乾燥することによって濾紙か

ら除去する。

【0151】次いで、約0.3mMのTBPBのような約0.05～約0.6mMの指示色素、および5% (W/V)のポリマーIIのような約1%～約8% (W/V)の一般式

(I)の疎水性高分子化合物を含有するテトラヒドロフラン (THF) またはエタノール溶液を調製する。クエン酸緩衝剤を包含する乾燥した濾紙のストリップを、次いで指示色素およびポリマーIIを含有するTHFまたはエタノール溶液で飽和する。

【0152】約50℃で約15～約30分間の炉乾燥によってTHFまたはエタノール溶媒を除去した後、試薬含浸濾紙ストリップを、適当なサイズ、例えば、約0.25cm×約0.5cm～約0.5cm×約1.0cmの大きさを有するパッドに切断する。試薬含浸濾紙パッドを、次いで両面粘着剤をつけたプラスチックハンドルに固定して、試験ストリップを提供する。

【0153】次いで、試験ストリップを、新鮮な非遠心処理尿試料に、試験パッドを試料で飽和するのに十分な時間浸漬する。試験ストリップは、尿試料によるろ紙からの緩衝剤の抽出を回避するために、約3～5秒より長い時間尿試料に浸漬すべきではない。試験ストリップを尿試料から除去し、予め決められた時間、例えば約1分～約2分待機した後、試験ストリップを、視覚的にまたは計器によって応答に関して試験する。試験パッドの色遷移は、もしあれば、尿試料中のタンパク質の存在および/または濃度を明らかにする。

【0154】本発明の方法および組成物を利用するタンパク質に関する定量的検定を企画するために、試薬パッドのサイズ、指示試薬組成物の強力度、試験試料の量、および、例えば浸漬よりピベッティングによる等の試験試料の試験具への導入方法の間の正しいバランスを決定することは、十分に試験具調製の業界の当業者の実験技術の範囲内である。

【0155】多くの場合、試験ストリップの簡単な視覚的観察が望ましい情報を提供する。より正確な情報が必要な場合、種々の既知のタンパク質濃度に対応する色スポットを有する色チャートを、試験ストリップに包含した特定の指示試薬組成物について調製し得る。すると、尿試料との接触後に生じる試験ストリップの色は、試験試料のタンパク質濃度を測定するためにチャート上の色スポットと比較し得る。

【0156】さらにより正確な測定が必要な場合、分光光度計または比色計を用いて色遷移の度合いをより正確に測定し得る。さらに、色遷移の度合いをより信頼でき

るようにより正確に測定し、したがって、試験試料中のタンパク質濃度を、特に0mg/dL～約30mg/dLのような低タンパク質濃度でより正確に測定するために、乾相試験ストリップ検定は、視覚的技術に対立するものとして分光光度または比色技術を用いることによって定量的に行い得る。

【0157】本明細書中で後により十分に考察されるように、本発明の指示試薬組成物を用いて試験試料中のタンパク質の陰性濃度と痕跡濃度との間を検出し、識別する能力は、驚くべきことに、および予期せぬことに、液体試験試料の総タンパク質濃度に関して検定する改良された方法を提供する。例えば、現在の方法に従えば、臨床的に有意の痕跡量のタンパク質 (例えば、約15～約30mg/dL タンパク質) を示す検定と陰性検定 (例えば、約15mg/dL 以下のタンパク質) との識別は困難であり、それにより多数の擬陽性検定が生じる。

【0158】擬陽性検定の主要な原因は、タンパク質検定の試料比重に対する依存性である。したがって、本発明の方法までは、乾相試験ストリップは、事実上試験試料比重非依存性ではなく、尿中にしばしば見出されるタンパク質の陰性濃度と痕跡濃度とを一貫して識別するのに利用可能でもなかった。したがって、本発明の重要な特徴に従えば、本発明の指示試薬組成物を好適な担体マトリックスに包含させることによって、事実上尿試料の比重に依存しない乾相試験ストリップを用いて尿試料中のタンパク質の陰性または痕跡濃度の存在を測定し、互いに識別することができることが明らかになった。

【0159】

#### 【実施例】

##### 実施例1

本発明の方法および組成物によって達成される新規で予期されなかった結果を立証するために、一般式 (I) の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を調製し、次いで、試験試料の総タンパク質含量に関する乾相試験ストリップ検定に用いた。指示色素であるテトラプロモフェノール・ブルー (TBPB) は、タンパク質と相互作用し、約3.5のpHで色遷移を起こす。TBPBはタンパク質非存在下では黄色であり、タンパク質の存在下ではその量の増加につれて、黄色がかった緑色～緑色～青色にわたって色を変化する。結果として、好適な緩衝剤でpH3.5に調整・維持された適当量のTBPBを含有する指示試薬組成物は、標準化タンパク質溶液との接触に際して、表1に示す色遷移を生じた。

【0160】

表1

標準化タンパク質溶液との接触の際のTBPB含有指示試薬組成物の色遷移

(pH3.5)

標準化タンパク質溶液の濃度 (mg/dL)

0～15 (陰性)

15～30 (痕跡)

観察された色

黄色

黄色がかった緑色

30  
100  
300  
2000

明緑色  
中緑色  
青緑色  
暗青緑色

# 【0161】実施例2

本発明の指示試薬組成物を用いることによって達成される新規で予期せぬ結果を示すために、本発明の指示試薬組成物を包含する試験ストリップを調製し、次いで、0 mg/dL ～約30 mg/dL の範囲のアルブミンを含有する標準化尿試料の検定において、従来の試験ストリップと比較した。

【0162】最初に、上記の二つの浸漬手順によって二組の乾相試験ストリップを調製した。全ての試験ストリップに、担体マトリックスとしてWHATMAN CCP500濾紙を利用した。全ての試験ストリップを、pH3.5に緩衝された0.50Mクエン酸カリウム溶液中に浸漬し、次いで乾燥した。次いで、試験ストリップの一部、試験ストリップAに、THF中0.30mMTBPB溶液を包含させた。試験ストリップAは、従来技術の試験ストリップである。クエン酸緩衝剤を包含するその他の試験ストリップに、0.30mMTBPBおよび5% (W/V) ポリマーIIを含有するTHF溶液を包含させた。これらの試験ストリップは、試験ストリップBであり、本発明の指示試薬組成物を包含した。

【0163】尿中の0 mg/dL ～30 mg/dL アルブミンを検出する能力に関して、試験ストリップAを試験ストリップBと比較した。特に、約1.007の低SGを有し、イムノアッセイでアルブミンを含まないことが示されたブルー尿に、ヒト血清アルブミンを種々の臨床的に有意のアルブミンレベルになるよう添加した。添加尿試料は、0、10、15、20、または30 mg/dL のアルブミンを含有した。次いで、これらの標準化尿試料を、尿タンパク質を検出し、0 mg/dL ～約30 mg/dL タンパク質の範囲の尿タンパク質検定を識別する能力に関して、試験ストリップAを試験ストリップBと比較するために用いた。

【0164】試験ストリップAと試験ストリップBの各々を、標準化尿試料中に浸漬し、次いで、試験試料中のタンパク質含量に対する応答に関して試験した。図1は、試験ストリップAおよび試験ストリップBのアルブミンに対する用量-反応を説明する。特に、図1は、アルブミン濃度 (mg/dL) 対630nmにおけるK/Sに関する二つの用量-反応プロットを含む。個々の検定結果は、この特定の分析対象物の測定のための波長で、好適な時間に反射率光度計で反射率測定値を取ることで測定した。0～1の反射率目盛りで取った反射率を、以下のKubelka-Munk関数に組み入れた：

$$【0165】K/S = (1 - R)^2 / 2R$$

(式中、Kは吸収係数、Sは散乱係数、およびRは反射率である)

【0166】図1において、K/S値は、試験試料中のアルブミン濃度に対してプロットされている。一般に、反射率が減少するにつれて、K/S値は増加するといわれている。

【0167】したがって、図1の二つの用量-反応プロットは、増加するアルブミン濃度の、K/S値に対する影響および一般式(1)の疎水性高分子化合物を指示試薬組成物中に含有することの影響を示す。反射率は、630nmの波長で測定し、次いでK/S値を計算した。このK/S値は、3回の反復測定の平均K/S値である。

【0168】図1から、アルブミン濃度が増加するにつれて、K/S値もまた増加することが観察される。したがって、反射率は減少したのであり、試験パッド中のより大きい色遷移を示す。図1の用量-反応プロットから、一般式(1)の疎水性高分子化合物、例えば、ポリマーIIを指示試薬組成物中に含有すると、図1の実線に説明されるポリマーを欠く指示試薬組成物と比較して、図1の点線に説明されるように、ヒト血清アルブミン(HSA)容量-反応プロットの切片と傾きの両方を低下させることも観察される。

【0169】本発明の組成物による約0.150から約0.108への切片の低下が、重要で予期せぬ結果であることは注意されるべきである。図1は、試験ストリップAに包含された従来技術の指示試薬組成物および試験ストリップBに包含された本発明の指示試薬組成物とが、標準化尿試料中のアルブミン量に対して、各々十分な感度を有することを示す。しかしながら、試験ストリップBに包含された本発明の指示試薬組成物が提供したより低い切片は、試験ストリップBが0 mg/dL のアルブミンを含有する試験試料と接触後、試験パッドの決定的な黄色を維持するのに対し、一方、試験ストリップAは、0 mg/dL アルブミンを含有する試験試料と接触後、黄色がかった緑色となることを示す。

【0170】比較のために、約0.2～約0.4の範囲のK/S値は、尿試料中の痕跡量のタンパク質に対応する。約0.2のK/S値を有する試験パッドは、明るい緑がかった黄色として視覚化される。痕跡量のタンパク質は、約15 mg/dL のタンパク質濃度から始まる。

【0171】したがって、試験ストリップAの黄色がかった緑色は、試験試料がおよそ5 mg/dL のアルブミンを含有するのみの場合に、痕跡量(約15 mg/dL)のアルブミンを含有するとして不正に解釈され得る。しかしながら、試験ストリップBは、試験試料中のアルブミンの痕跡濃度(約15 mg/dL)で、緑がかった黄色に正しく変わるのみである。したがって、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する本発明の指示試薬組成物は、試

験パッドの色を陰性検定の範囲に維持するのを助け、それにより痕跡量のアルブミンに関する擬陽性検定の数を実質的に減少する。結果として、痕跡アルブミンに関する実質的により少ない不必要な確認検定が実施される。

【0172】試験ストリップAおよび試験ストリップBを、イムノアッセイでアルブミンを含まないことが示された高比重（SG=1.023）尿試料の検定において

630nm (25秒)、0mg/dL アルブミンでのK/S		
試験ストリップ	低SG試料	高SG試料
A	0.151±0.010	0.199±0.013
B	0.097±0.002	0.102±0.003

【0174】示したデータから、陰性量のアルブミン（0mg/dL）を含有する高SG尿試料は、試験パッドに従来技術の指示試薬組成物を包含した場合（試験ストリップA）、0.199の値を示すことが観察される。これに対して、陰性量のアルブミンを含有し、従来技術の指示試薬組成物で検定された低SG尿試料は、0.151の値を示す。上記に考察したように、低SG尿試料の0.151の値は、痕跡量のタンパク質として不正に解釈され得る、ブランク反応についての緑がかった黄色として現われる。したがって、高SG尿試料によって示された0.199の値は、ブランク反応についての緑がかった黄色を呈し、これはさらに緑色領域までも転置され得るので、それにより臨床的に有意の痕跡量のタンパク質に関する検定として、より容易に不正に解釈される。

【0175】したがって、タンパク質に関する検定において用いられる従来の組成物は、試験パッドの色変化が試験試料の比重に直接関連するため、許容できない程多数の擬陽性検定を提供した。高SG尿試料は、試験ストリップの反応性において、低SG尿試料を越える有意の増加を示し、したがって、より多数の擬陽性検定を示した。これに対して、一般式（1）の疎水性高分子化合物を含有する本発明の指示試薬組成物は、タンパク質に関する乾相試験ストリップ検定におけるパラメーターとしては、比重を排除する。

【0176】前記に考察したように、従来の組成物を包含する試験ストリップ（試験ストリップA）でのK/S値である0.151と比較して、本発明の指示試薬組成物を包含する試験ストリップ（試験ストリップB）は、0mg/dL アルブミンを含有する低SG尿試料についてのK/S値を0.097に低下させる。説明したように、反応性のこの減少は、陰性量のアルブミンを含有する低SG尿試料の検定において黄色を呈する試験パッドを提供する。

【0177】驚くべきことに、陰性量（0mg/dL）のアルブミンを含有する高SG尿試料は、本発明の組成物を包含する試験ストリップBで検定すると、0.102のK/S値を示す。この反応性もまた、アルブミンに関する陰性検定として容易に解釈される黄色を呈する試験パッドを提供する。したがって、試験試料の比重は、本発

も比較した。試験ストリップAを試験ストリップBと比較するために用いた、アルブミンを含有しない（陰性試料）低SG尿試料および高SG尿試料との両方に関する検定結果を以下に示す。高SG尿試料および低SG尿試料の両方が、0mg/dLアルブミンを含有した。

【0173】

明の指示試薬組成物を包含する試験パッドによって示される色変化に事実上影響しないことが示された。結果として、タンパク質に関するより少数の擬陽性検定が生じる。

【0178】示したデータは、従来の組成物を含有する試験ストリップで検定された高SG尿試料は、0.199のK/S値と決定的な緑がかった黄色の試験パッドを示し、一方、本組成物を含有する試験ストリップで検定された高SG尿試料は、0.102のK/S値と黄色の試験パッドを示したことを表わす。したがって、本指示試薬組成物が高SG尿試料の存在下で試験ストリップの反応性を減少し、高SG尿試料に存在する干渉による擬陽性検定の発生を実質的に減少することが示された。

【0179】

【発明の効果】結果として、試験試料中のタンパク質の存在および濃度を検出するために本指示試薬組成物を用いることは、驚くべきことに、および予期せぬことに、試験試料中の陰性および痕跡量のタンパク質の検出および識別を可能にすることが明らかになった。さらに、本検定は、試験試料の比重に依存せず、またそれによって悪影響を受けない。このような予期せぬ改良は、一般式（1）の疎水性高分子化合物を欠き、試験試料中のタンパク質含量に関して検定するために用いられる従来の指示試薬組成物を越える、重要で有用な利点を提供する。

【0180】図1および上に示したデータに説明するように、従来の方法および組成物は、深刻な比重干渉および約15mg/dL以下の陰性アルブミン濃度と約15～約30mg/dLの臨床的に有意の痕跡アルブミン濃度とを有効に識別することの不可能の両方の欠点を有する。しかしながら、これに対して、試験試料中のアルブミンに関して検定するために本発明の指示組成物を包含する試験具を用いて、検定者は、許容できない程多数の擬陽性検定を生じることなしに、陰性～痕跡量のタンパク質を含め、総タンパク質濃度に関して試験試料を信頼できるように検定することができる。

【0181】本発明の方法および組成物を利用する検定は、視覚的に検出可能な色差を示し、試験試料の比重に依存しないので、試験試料中の陰性および痕跡量のアルブミンを検出および識別することを可能にするために、

指示色素、緩衝剤および一般式(1)の疎水性高分子化合物を含む十分な量の特に有効な指示試薬組成物を包含する至適の試験ストリップを、試験キットを企画する業界の当業者は企画し得ることは理解されるべきである。本発明の方法および組成物は、約15mg/dL以下のアルブミンを含有する試験試料と約15～約30mg/dLのアルブミンを含有する試験試料とを、検定者が識別することを可能にし、それにより擬陽性検定の数を実質的に減少する。

【0182】全体として、濾紙のような好適な担体マトリックスに包含された本発明の指示試薬組成物は、異なるタンパク質濃度を有する試験試料間の検定の色解像を改良し、液体試験試料の総タンパク質含量に関する擬陽性結果を、特に約30mg/dL以下の低タンパク質レベルで排除する。さらに、本組成物は、比重干渉を受けない。本発明の方法および組成物は、本指示試薬組成物を含浸した担体マトリックスと0mg/dL～30mg/dLの間のタンパク質レベルを有する試験試料との接触から生じる色遷移の視覚的識別を可能にし、それにより許容できない程多数の擬陽性検定を生じることなしに、陰性～痕跡量のタンパク質を含有する試験試料の正確で信頼に値

する検定を提供する。

【0183】したがって、本発明の重要な特徴に従えば、一般式(1)の疎水性高分子化合物を含有する指示試薬組成物を利用することによって、尿またはその他の試験試料中の総タンパク質含量、特に陰性または痕跡総タンパク質含量に関するより正確で信頼できる検定を実施し得る。本指示試薬組成物は、異なるタンパク質濃度を有する試験試料間の試験ストリップの色解像を改良し、それにより特におよそ30mg/dL以下の陰性～痕跡アルブミンレベルで検定感度を改良する。

【0184】明らかに、本明細書中に記載されたとおりの発明の多くの修正および変異を、本明細書の精神および範囲を逸脱することなく為すことができ、したがって、付加された請求項によって示されるような制限のみが課せられるべきである。

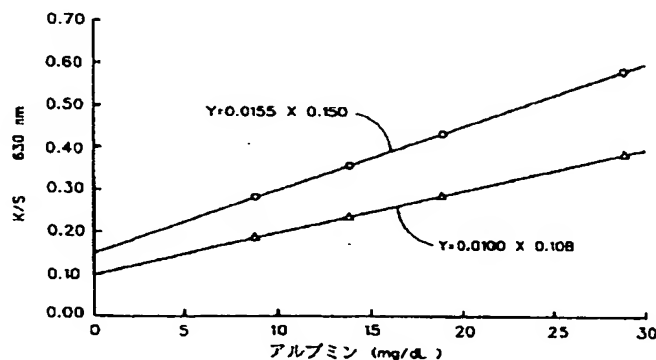
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ポリマーIIを含有する、または含有しない試験ストリップを用いて作製した、630nmでのアルブミン濃度(mg/dL)対Kubelka-Munk関数(K/S)の用量-反応プロットである。

【図1】

TBPBストリップに対するポリマーIIの影響  
尿中(SG=1.007)HSA用量-反応

- 対照、ポリマーなし
- ▲ ポリマーII, 5.0% (W/V)



フロントページの続き

(72) 発明者 マイケル・サルベッチ  
アメリカ合衆国、ミネソタ州、55104、セント・ポール、テンブル・コート 2071

(72) 発明者 ロナルド・ジー・ソマー  
アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、エルクハート、マール・ドライブ 55745